

008415766

WPI Acc No: 90-302767/199040

XRAM Acc No: C90-130814

XRPX Acc No: N90-232756

**Method for detecting DNA - includes de-naturing to single strand, combining with DNA primer having corresp. base sequence forming replicator etc.**

Patent Assignee: SHIMADZU SEISAKUSHO KK (SHMA )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 2215399	A	19900828	JP 8935670	A	19890215		199040 B
JP 2727625	B2	19980311	JP 8935670	A	19890215	C12Q-001/68	199815

Priority Applications (No Type Date): JP 8935670 A 19890215

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 2215399	A		7			
JP 2727625	B2		5	Previous Publ.		JP 2215399

Abstract (Basic): JP 2215399 A

Detection comprises denaturing the DNA to single-stranded DNA, combining single-stranded DNA with a DNA primer comprising a short chain oligonucleotide that has a base sequence corresp. to the DNA sequence and which combines with a functional gp. for fixing DNA through a disulphide bond. Forming a replicator of the objective DNA which is modified with the DNA fixing gp. by making the single-stranded DNA having the DNA primer combined to react with a nucleotide agent in the presence of polymerase, fixing the objective DNA to a water-insoluble carrier which has a functional gp. that can react and combine with the DNA fixing gp. by making the replicator of the objective DNA to react with the carrier, staining the DNA by making an absorbent or fluorescent DNA stain agent to react with the carrier in an aq. solvent, and detecting the objective DNA based on the absorbance or the fluorescence of the stained DNA.

USE/ADVANTAGE - By this method, DNA can be easily detected without complicated steps such as hybridisation, fixing to a support, etc..

(7pp Dwg.No.0/0

Title Terms: METHOD; DETECT; DNA; DE; SINGLE; STRAND; COMBINATION; DNA; PRIME; CORRESPOND; BASE; SEQUENCE; FORMING; REPLICA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12N-015/09;

G01N-033/58

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B03B; B04-B04A1; B11-C07B2; B11-C07B3;

B12-K04A3; D05-H09; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M750 M903 N102 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M2):

\*02\* D022 D029 E111 H1 H103 H142 M210 M211 M273 M283 M320 M412 M511 M520

M530 M540 M640 M781 M903 M904 N102 P831 Q233 Q505 R03901-D R03901-U

Chemical Fragment Codes (M6):

\*03\* M903 P831 Q233 R514 R614 R625 R639

Specific Compound Numbers: R03901-D; R03901-U



⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-215399

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)8月28日

C 12 Q 1/68  
C 07 H 21/04  
G 01 N 33/58

A 6807-4B  
Z 7822-4C  
A 7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 核酸の検出法

⑯ 特 願 平1-35670

⑰ 出 願 平1(1989)2月15日

⑱ 発 明 者 多 田 淳 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

核酸の検出法

## 2. 特許請求の範囲

1. (a) 目的DNAと一本鎖DNAに変性する工程、

(b) 上記一本鎖DNAに、目的DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有する短鎖のオリゴヌクレオチドからなりかつジスルフィド結合を介してDNA固定用官能基を有してなるDNAプライマーを結合させる工程、

(c) DNAプライマーが結合した一本鎖DNAに、ポリメラーゼの存在下でヌクレオチド試薬を作用させることによりDNA固定用官能基で修飾された目的DNAの複製物を作製する工程、

(d) 複製された上記目的DNAを上記DNA固定用官能基と反応して結合しうる官能基を有する水不溶性担体に水系媒体中で作用させて、該目的DNAを水不溶性担体に固定する工程、

(e) 上記DNA固定水不溶性担体に吸光性又は

蛍光性のDNA染色剤を水系媒体中で作用させて該DNAを染色する工程、

(f) 染色されたDNAの吸光度又は蛍光強度に基づいて目的DNAを検出する工程、

からなる核酸の検出法。

## 3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

この発明は、核酸の検出法に関する。さらに詳しくは、目的DNAの検出を簡便に行うことができ、例えば生体内に存在しうる病理性遺伝子の検出や遺伝子学的研究等に有用な検出法に関する。

(ロ) 従来の技術

特定のDNAの検出のために、目的DNAと相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを利用し、これに蛍光物質、放射性同位体、酵素等による標識化を行ったいわゆるオリゴヌクレオチドプローブを用いる方法が知られている。

かかる従来のDNAの検出法は、基本的に、検体や細胞破砕液等のDNA含有試料をアルカリ処理や熱処理に付して目的DNAを一本鎖DNAに

変性する工程、この一本鎖DNAを、ナイロンやニトロセルロースメンブラン等の支持体に固定化する工程、固定化された一本鎖DNAに上記したオリゴヌクレオチドプローブを作用させてハイブリダイゼーションを行う工程、及びハイブリダイゼーション後のメンブランを洗浄した後、固定化DNAの標識部位の蛍光強度、放射活性、酵素活性等に基づいてDNAを検出する工程から構成される。

そして最近、微量の目的DNAの高感度検出手法として、上記した固定化工程の前に、目的DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有する短鎖（通常10～30ヌクレオチド）のオリゴヌクレオチドからなるDNAプライマーを結合させ、これにポリメラーゼの存在下でdATP、dGTP、dCTP、dTTPのようなヌクレオチド試薬を作用させることにより目的DNAを複製し、これを必要に応じて繰り返すことで目的DNAを増幅し、増幅された目的DNAについて再び一本鎖に変性して上記検出操作に付す方法も提案されてお

り、NAに、目的DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有する短鎖のオリゴヌクレオチドからなりかつジスルフィド結合を介してDNA固定用官能基を有してなるDNAプライマーを結合させる工程、(c)DNAプライマーが結合した一本鎖DNAに、ポリメラーゼの存在下でヌクレオチド試薬を作用させることによりDNA固定用官能基で修飾された目的DNAの複製物を作製する工程、(d)複製された上記目的DNAを上記DNA固定用官能基と反応して結合しうる官能基を有する水不溶性担体に水系媒体中で作用させて、該目的DNAを水不溶性担体に固定する工程、(e)上記DNA固定水不溶性担体に吸光性又は蛍光性のDNA染色剤を水系媒体中で作用させて該DNAを染色する工程、(f)染色されたDNAの吸光度又は蛍光強度に基づいて目的DNAを検出する工程、からなる核酸の検出法が提供される。

この発明は、DNA検出に際し、末端にジスルフィド結合を介して固定用官能基を有するDNAプライマーを用いて目的DNAを複製する点を第

一、いわゆるPCR(polymerase chain reaction)法によるDNA検出法として知られている。

(ハ) 発明が解決しようとする課題

しかしながら、いずれにせよ上記従来の検出法においては、支持体に一本鎖DNAを固定する際に、熱処理や紫外線照射処理を行う必要があり、専用の装置が必要になると共に、取扱いが煩雑で時間が掛かる不都合があった。さらに、固定化後に、ハイブリダイゼーションが必要になるため、固定化DNAを至適温度に保持する必要があり、上記と同様に専用の装置が必要であると共に、取扱いが煩雑であった。

この発明は、かかる状況下なされたものであり、目的DNAを簡便に検出でき、ことにハイブリダイゼーションや従来のごとき支持体への固定化処理を行うことなくDNA検出を行うことができる検出法を提供しようとするものである。

(ニ) 課題を解決するための手段

かくしてこの発明によれば、(a)目的DNAと一本鎖DNAに変性する工程、(b)上記一本鎖D

1の特徴とするものである。そして、複製された固定用官能基含有DNAを水不溶性の担体に固定した状態で染色を行い、この染色されたDNAの吸光度又は蛍光度に基づいて目的DNAの検出を行う点を第2の特徴とするものである。

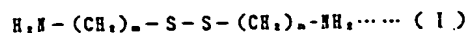
(DNAプライマー)

この発明で用いるDNAプライマーは、目的DNAの塩基配列の一部を相補的な塩基配列を有する短鎖のオリゴヌクレオチドに、ジスルフィド結合を介してDNA固定用官能基を結合することにより作製することができる。

ここで短鎖のオリゴヌクレオチドとしては、PCR法で用いられるDNAプライマーと同程度の長さ、通常10～30ヌクレオチド程度のもの、を用いるのが適しており、塩基配列は目的DNAの末端に対応させるのが適している。

かかるオリゴヌクレオチドに上記DNA固定用官能基を導入するに当り、まずジスルフィド基による化学修飾が行われる。この化学修飾は、オリゴヌクレオチドに、ジスルフィド結合を有し両端

に各々アミノ基を有するシスタミンのようなジアミノ化合物を水系中で作用させることにより行うことができる。ここで用いるジアミノ化合物としては、下式(1)：



(式中、m, nは各々1~12の整数を示す)

で現される化合物又はその塩を用いるのが通じている。

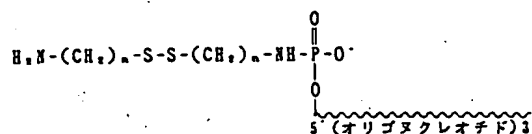
この化学修飾において、このジアミノ化合物残基がオリゴヌクレオチドに導入されるが、この導入位置は、オリゴヌクレオチドの5'末端か核酸塩基のいずれかに選択できる。

5'末端への導入は、通常、オリゴヌクレオチドにポリヌクレオチドキナーゼを水溶液中で作用させてその5'末端の水酸基をリン酸基に変換し、次いで緩和な条件下で、例えば、カルボジイミド系の縮合剤を用いて上記リン酸基とジアミノ化合物を反応させる、いわゆるホスホロアミデート法により行うことができる(Chu, B.F. et al. Nucl. Acids. Res. 11(1983)6513)。かかる反応により、

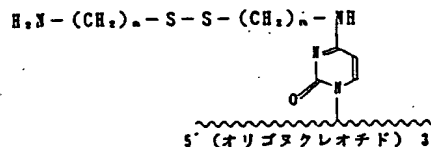
や電気泳動法等により精製してDNA固定用官能基を結合する工程に用いられる。

ここでDNA固定用官能基の結合は、上記で得られた化学修飾オリゴヌクレオチドを必要に応じて架橋剤を用いて、後述する水不溶性担体の官能基と水系媒体中で容易に反応して結合しうる他の官能基を有する化合物(DNA固定用化合物)と反応させることにより行うことができる。このようなDNA固定用化合物と水不溶性担体の官能基との組合せとしては、例えばビオチン/アビジンの組合せや、各種抗体/抗原の組合せが挙げられる。ビオチンを用いる場合には、アミノ基あるいはチオール基と反応性を有するビオチン誘導体が通じている。また、ハプテン(抗原基)を用いる場合には、チオール基を有するもの、あるいはアミノ基を有するものが通じており、又はアミノ反応性基と反応性を有する架橋剤[例えば、N-スクシンイミド-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネートやマレイミド-N-ヒドロキスクシンイミド誘導体類]と組み合わせ用いることができ

5'末端のリン酸基のOH基とジアミノ化合物の一端のアミノ基との脱水縮合反応が生じて、下式のように上記ジアミノ化合物残基がオリゴヌクレオチドに導入されることとなる。



一方、核酸塩基への導入は、よく知られたシトシンの4位のアミノ基転位反応を利用することにより行うことができる。かかる反応によりオリゴヌクレオチドの核酸塩基におけるオキシ基とジアミノ化合物の一端のアミノ基との脱水縮合反応が生じて例えば下式のようにジアミノ化合物残基がオリゴヌクレオチドに導入されることとなる。



このようにして反応液中に得られた化学修飾オリゴヌクレオチドは、通常、液体クロマトグラフィ

る。かかる結合反応は、通常上記DNA固定用化合物を、必要に応じて架橋剤と水系中で反応させた後、前述した化学修飾オリゴヌクレオチドと水系中で反応させることにより行うのが通じている。いずれの反応も、緩和な条件下で混合することにより進行させることができる。

なお、架橋剤及びDNA固定用化合物の使用量は、化学修飾オリゴヌクレオチドに対し、5~25当量とするのが通じている。

(DNAの複製)

このようにして得られたDNA固定用官能基を有するDNAプライマーを用いて一本鎖DNAから目的DNAの複製が行われる。かかるDNAプライマーは(+) (-)の二種類同時に用いることもできる。この複製の手順、方法は、いわゆるPCR法における複製の手順と同様にして行うことができる。すなわち水系媒体中でアルカリ処理又は加熱処理により目的DNAを一本鎖DNAに変性した後、上記DNAプライマーを添加して緩

和な温度下でアニーリングを行い、次いでポリメラーゼと順次ヌクレオチド試薬(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)を添加して一本鎖DNAを鋳型として相補的なポリヌクレオチド鎖を成長させることにより行うことができる。なお、目的DNA自体は、PCR法で増幅されたものを用いてもよく、高感度検出の点で増幅されたものを用いるのが好ましい。

#### (固定)

上記複製DNAを固定する担体としては、複製DNAにおけるDNA固定用官能基を反応して結合しうる他の官能基を有する水不溶性担体を用いられる。かかる担体の材質としては、水系媒体中で分散しうる粒状体を用いるのが適しており、例えばアクリルアミドゲル、セファロースゲルのような有機ポリマーからなる粒状体、やシリカゲルのような無機物質からなる粒状体が挙げられる。また、上記他の官能基としては、前述したごとき、アビジン残基や抗体を用いることができ、これらは公知の手法により上記担体に化学固定、物理固

#### (DNA検出)

検出は、染色されたDNAの吸光度又は蛍光測定に基づいて光学的に行われる。この光学的検出は、染色されたDNAを固定した担体を、適当な支持体(例えば、濾紙、ガラスフィルタ等)に担持させた状態で行うこともできるが、高感度検出の観点から、染色されたDNA固定水不溶性担体に還元剤を水系媒体中で作用させて固定化されたDNAのジスルフィド結合を開裂して上記水不溶性担体から染色DNAを分離し、この分離された染色DNA含有水系媒体を光学的分析に付してその吸光度又は蛍光度を測定するのが好ましい。この際用いる還元剤としては、例えばジチオスレイトール、メルカプトエタノール、メルカプトエチルアミン等が挙げられる。

#### (ホ) 作用

水不溶性担体と特異的に結合しうるDNA固定用官能基を有するDNAプライマーを用いることにより、複製DNAを該担体に効率良く固定することができる。そしてDNAの検出は染色法で

定手法等により固定した状態で用いることができる。

複製DNAの上記担体への固定は、緩和な温度下、水系中でこれらを混合することにより迅速に行われ、とくに熱処理や紫外線照射処理等を施す必要はない。

この固定化が行われた後、水洗により夾雑成分や未反応成分を系から効率良く除去することができる。通常、この水洗後に次の染色工程が行われる。

#### (染色)

この発明でDNA染色剤とは、吸光性又は蛍光性を有しかつ水性媒体中でDNA二本鎖内に迅速に取り込まれる水溶性物質を意味し、とくに可視光での吸光性を有するものでなくてもよい。通常、高感度検出の点で蛍光性を有するものを用いるのが適しており、この例としてはエチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ等が挙げられる。

かかる染色工程の後に、DNAの検出が行われるが、通常、この検出の前に、洗浄が行われこれにより過剰の染色剤が効率良く除去できる。

られるが、染色法されたDNAが不溶性担体に固定されているため、水洗により夾雑成分等と容易に分離することができる。

従って、従来のごとき支持体への煩雑な固定処理や熱処理を行うことなくしかも煩雑なパイブリダイゼーションを行うことなく、DNAの簡便な検出や高感度な検出が可能となる。

#### (ヘ) 実施例

##### 1. オリゴヌクレオチドの化学修飾

##### (1) オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドとしては、M13mp8用のプライマー(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'及び5'-TTGTGTGGAATTGTGAGC-3')を島津自動合成機NS-1で化学合成後HPLC精製したものをを用いた。このプライマーは、M13mp8RF-DNA(目的DNA)(+)鎖あるいは(-)鎖に相補的な配列をもつ17量体あるいは18量体である。

なお、鋳型としてM13mp8RF I DNAプライマーとして上記した2種のプライマーを用い

てPCR反応を行うと約120量体の位置に相当する電気泳動パターンが得られた。本結果は予想位置と一致した。

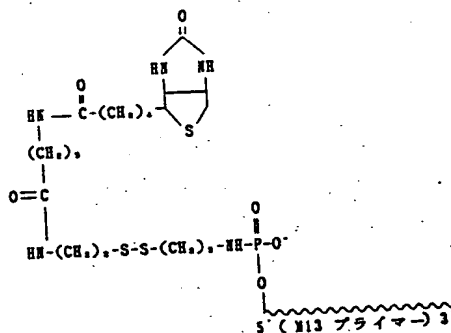
## (2) 反応

### ① リン酸基の導入

上記オリゴヌクレオチドの溶液(50D、30μl)をT<sub>4</sub>ポリヌクレオチドキナーゼ30ユニットで処理(37℃ 2.5時間)し、5'位ペリン酸残基を導入した。反応溶液をSEP PAK C1<sup>®</sup>カラムを用いて精製し3μlの溶出液を得た。溶出液を減圧下真空濃縮した。

### ② シスタミン残基の導入

5'位リン酸化ブローブ(10D)を、縮合剤としての1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDCI)(1M 10μl)の存在下、ルチジンバッファー(pH7.5、0.15M、88μl)中で、シスタミン[H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>]の2塩酸塩(1M、2μl)と室温で一昼夜反応させた。反応溶液はHPLCにて目的ピークを回収し、減圧下真空濃縮した。

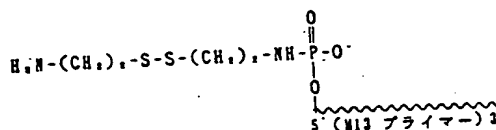


### 3. 目的DNAの複製

M13mp8RF-DNA 1 μmol (10<sup>-11</sup> mol) を目的DNAとして用い、上記で合成した5'-ビオチン化プライマー(50pmol)及び未修飾プライマー(50pmol)、Taqポリメラーゼ、ヌクレオチド試薬dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)を加えて、これをPCR法により40回増幅した。これにより、5'-ビオチン化プライマーがPCR反応で増幅した2本鎖DNA断片に結合されたことになる。

### 4. 水不溶性担体への固定

これにより下式に示す化学修飾(シスタミン導入)されたオリゴヌクレオチドを得た。



### 2. DNA固定用官能基の導入

上記で得られたシスタミン導入オリゴヌクレオチド(0.70D)をPBS 100μlに溶解し攪拌下、25倍当量のビオチン-ε-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドを添加して室温下2時間反応させることにより、下記のような5'-ビオチン化プライマーを合成し、HPLCあるいはゲル電気泳動で精製した。

(以下余白)

アビジンを直接架橋したアガロースビーズを1×SSCで2回洗浄したものを、上記ビオチン修飾DNA含有水溶液中に添加した。ビオチンとアビジンの結合定数は非常に大きいため上記ゲルの添加混合によりビオチン修飾DNAが室温下で速やかに該ビーズ(水不溶性担体)に固定されることとなる。

### 5. DNAの染色

上記固定化の後、この固定化物をポアサイズ0.45μmのフィルタで濾取し、バッファーで十分に洗浄することによって、未反応の一本鎖DNA、プライマー、その他夾雑物を除去した。

次いで固定化物をアクリジンオレンジの水溶液に接触させることにより、染色を行った。染色後に水で十分に洗浄することにより、過剰のアクリジンオレンジを除去した。

### 6. DNAの検出

上記のようにしてフィルタ上に担持された染色化DNA固定物に、還元剤としてのメルカプトエチルアミン(0.1M)を含むリン酸緩衝液を加え

特開平2-215399(6)

37℃で90分反応させた。これにより染色化DNA固定化物におけるジスルフィド結合が速やかに開裂し、染色化DNAが液相に分散溶解し、水不溶性担体と分離された。

このDNA含有水溶液について、蛍光光度計を用いてその蛍光度(E<sub>x</sub>490nm)を測定したところ、530nmと640nmに明確な蛍光ピークが確認された。そして、この両ピークの強度比は、530nm>640nmであり、アクリジンオレンジ水溶液自体の強度比を逆転していることから、DNAの二本鎖中に捕り込まれたアクリジンオレンジによるものであることも確認された。

一方、染色剤としてエチジウムブロマイドを用いた際には、E<sub>x</sub>300nmで590nmの蛍光ピークが呈されるが、この蛍光ピーク強度は、一本鎖DNAに結合したエチジウムブロマイド水溶液に比して増大化されたものであり、二本鎖DNAの捕り込まれたエチジウムブロマイドによるものであることも確認された。

(ト) 考案の効果

この発明の核酸の検出法によれば、従来のとき煩雑な固定化処理やハイブリダイゼーションを行うことなく、簡便に目的DNAを検出することができ、しいては自動化、装置化が容易となり、従来に比してより高感度な検出も可能である。

代理人 弁理士 野 河 信太郎



## 手続補正書

平成元年 6月30日



特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示

平成1年特許願第35670号

2. 発明の名称

核酸の検出法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地

名 称 (199)株式会社 島津製作所

代表者 西 八 條 實

4. 代理人 〒530

住 所 大阪市北区西天満5丁目1-3クオーター・ワンビル

電話(06)365-0718

氏 名 弁理士(6524)野 河 信太郎



5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」及び「発明の詳細な説明」の欄

8. 補正の内容

別紙のとおり

### 補正の内容

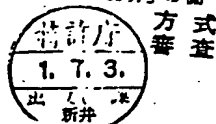
1. 明細書第4頁下から2行目の「目的DNAと」を「目的DNAを」に訂正する。

2. 同書第6頁第15~16行目の「用いるのが通しており、塩基配列は目的DNAの末端に対応させるのが通している。」を「用いるのが通している。」に訂正する。

3. 同書第16頁の式の下3行目の「100μl」を「100μl」に訂正する。

4. 同書第19頁下から4行目の「二本鎖DNAの」を「二本鎖DNAに」に訂正する。

5. 同書同頁の最下行の「(ト)考案の効果」を「(ト)発明の効果」に訂正する。



特許請求の範囲

基づいて目的DNAを検出する工程、  
からなる核酸の検出法。

1. (a)目的DNAを一本鎖DNAに変性する工程、

(b)上記一本鎖DNAに、目的DNAの塩基配列の一部と相補的な塩基配列を有する短鎖のオリゴヌクレオチドからなりかつジスルフィド結合を介してDNA固定用官能基を有してなるDNAプライマーを結合させる工程、

(c)DNAプライマーが結合した一本鎖DNAに、ポリメラーゼの存在下でヌクレオチド試薬を作用させることによりDNA固定用官能基で修飾された目的DNAの複製物を作製する工程、

(d)複製された上記目的DNAを上記DNA固定用官能基と反応して結合しうる官能基を有する水不溶性担体に水系媒体中で作用させて、該目的DNAを水不溶性担体に固定する工程、

(e)上記DNA固定水不溶性担体に吸光性又は蛍光性のDNA染色剤を水系媒体中で作用させて該DNAを染色する工程、

(f)染色されたDNAの吸光度又は蛍光強度に